

## Pharmaceutical products with antithrombotic activity and process for the production thereof

Publication number: DE4432549

Publication date: 1995-03-16

Inventor:

Applicant: HUR KYE SUNG (KR)

Classification:

- International: A61K31/35; A61K31/35; (IPC1-7): A61K31/35; A61K35/78; C07D311/62

- european: A61K31/35; A61K35/78

Application number: DE19944432549 19940913

Priority number(s): KR19930018376 19930913

Also published as:



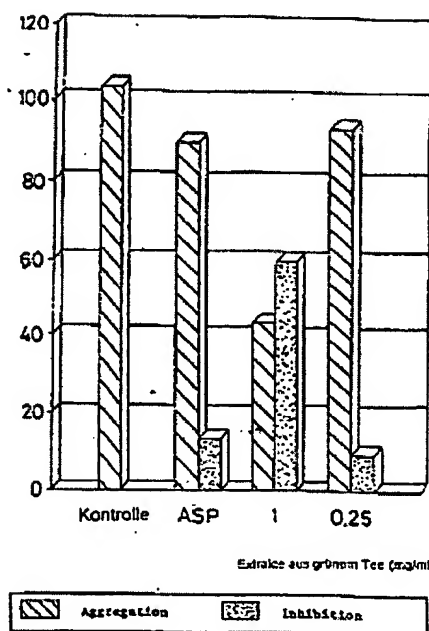
JP7258103 (A)

FR2709965 (A)

Report a data error

### Abstract of DE4432549

The present invention relates to pharmaceutical products with antithrombotic, thrombogenesis-inhibiting or thrombosis cause-inhibiting activities. Stated more accurately, the present invention relates to pharmaceutical products which contain pharmacologically acceptable powdered extracts from green tea leaves as stable active ingredient which has an excellent inhibitory activity on the causes of thrombosis, and which are produced using an improved progressive process. The present invention provides products with antithrombotic activity which contain an extract from green tea as active ingredient and conventional ancillary substances which are generally used for pharmaceutical products, such as vehicles, diluents, antioxidants etc., and furthermore a process for the production thereof.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide





(7)

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 32 549 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**A61 K 35/78**  
C 07 D 311/62  
// A61K 31/35

②1 Aktenzeichen: P 44 32 549.5  
②2 Anmeldetag: 13. 9. 94  
④3 Offenlegungstag: 16. 3. 95

DE 44 32 549 A 1

③0 Unionspriorität: ③2 ③3 ③1  
13.09.93 KR 18376/93

⑦1 Anmelder:  
Hur, Kye Sung, Seoul/Soul, KR

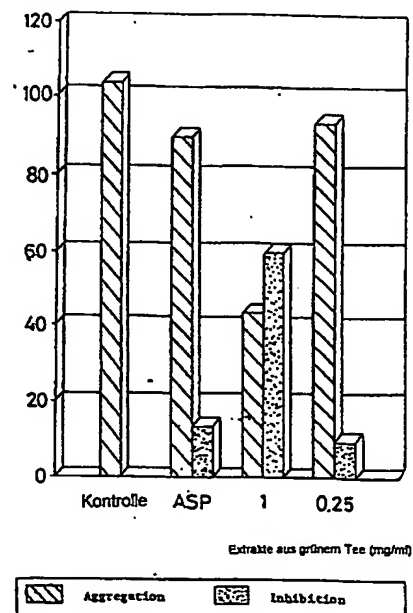
⑦4 Vertreter:  
Kuhnen, R., Dipl.-Ing.; Wacker, P., Dipl.-Ing.  
Dipl.-Wirtsch.-Ing.; Fürniß, P., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat.; Brandl, F., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte;  
Hübner, H., Dipl.-Ing., Rechtsanw.; Winter, K.,  
Dipl.-Ing.; Roth, R., Dipl.-Ing.; Röß, W.,  
Dipl.-Ing.Univ.; Kaiser, J.,  
Dipl.-Chem.Univ.Dr.rer.nat.; Pausch, T.,  
Dipl.-Phys.Univ.; Henninger, B., Dipl.-Ing. Univ.,  
Pat.-Anwälte, 85354 Freising

⑦2 Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Pharmazeutische Erzeugnisse mit Antithromboseaktivität sowie Verfahren zu ihrer Herstellung

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Erzeugnisse mit antithrombotischen, Thrombogenese-hemmenden oder Thromboseursachen-hemmenden Aktivitäten. Genauer ausgedrückt betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Erzeugnisse, welche pharmakologisch annehmbare gepulverte Extrakte aus grünen Teeblättern als neuen und stabilen Wirkbestandteil, der eine überragende Thromboseursachen-hemmende Aktivität hat, enthalten und unter Verwendung eines verbesserten progressiven Verfahrens hergestellt werden.  
Die vorliegende Erfindung liefert Erzeugnisse mit Antithromboseaktivität, welche einen Extrakt aus grünem Tee als Wirkbestandteil und herkömmliche Hilfsstoffe, welche allgemein für pharmazeutische Erzeugnisse verwendet werden, wie z. B. Vehikel, Verdünnungsmittel, Antioxidanzien usw., enthalten, und weiterhin ein Verfahren zu deren Herstellung.



DE 44 32 549 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 01. 95 408 081/634

20/35

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Erzeugnisse gemäß Anspruch 1 mit antithrombotischen, Thrombogenese-hemmenden und Thromboseursache-hemmenden Aktivitäten.

5 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung dieser pharmazeutischen Erzeugnisse gemäß Anspruch 9 sowie ein allgemeines Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus grünem Tee gemäß Anspruch 11.

Genauer gesagt, betrifft die vorliegende Erfindung pharmazeutische Erzeugnisse mit antithrombotischen, Thrombogenese-hemmenden und Thromboseursache-hemmenden Aktivitäten, welche pharmakologisch an-  
10 nehmbar gepulverte Extrakte aus Blättern von grünem Tee als einen Wirkstoff enthalten, welcher neu und stabil ist, und eine hervorragende Aktivität bei der Thromboseursachenhemmung aufweist und hergestellt wird, indem ein verbessertes progressives Verfahren verwendet wird (hiernach werden antithrombotisch, Thrombo-  
15 genese-hemmend und Thromboseursache-hemmend als "antithrombotisch" bezeichnet).

Grüner Tee ist im Fernen Osten, ausgehend von China und Japan, als ein Luxusartikel mit medizinischen  
15 Werten anerkannt worden.

Die Blätter von grünem Tee enthalten Gerbstoffe aus grünem Tee (Tannine), Koffein, Ascorbinsäure, Toco-  
pherole, Flavonole, Polysaccharide und  $\beta$ -Carotin usw. als chemische Bestandteile. Unter diesen sind Koffein,  
20 Ascorbinsäure und die Tannine aus grünem Tee die Hauptbestandteile. Koffein und Ascorbinsäure sind in vielen anderer Kräutertees enthalten, jedoch stellen die Tannine aus grünem Tee, welche durch die Catechine verkör-  
25 pert werden, einen außergewöhnlichen Bestandteil dar, welcher nur in grünem Tee gefunden wird. Vier Haupt-  
catechine in grünem Tee sind Epicatechin, Epicatechingallat, Epigallocatechin und Epigallocatechingallat. Ande-  
re anorganische Substanzen, wie zum Beispiel Fluor, Zink, Calcium und Magnesium sind ebenfalls enthalten.

Es war bekannt, daß Catechine aus grünem Tee verschiedene Wirkungen zeigen, unter anderem als Hauptwir-  
30 kung die Hemmung der Lipidhyperoxidation und zusätzlich die Hemmung der Reaktion von aktivem Sauerstoff,  
von welcher angenommen wird, daß sie viele Arten von Krankheiten verursacht, die Hemmung der Cholesterol-  
reabsorption, anticarcinogene Aktivität, antivirale-antibakterielle Aktivität, antikariöse Aktivität und desodorie-  
25 rende Aktivität usw. In den frühen 90er Jahren wurde entdeckt und berichtet, daß Epigallocatechingallat, eines  
der Catechine, die Entstehung von Carcinogenen und die Wirkung von carcinogenen Promotoren unterdrückt.  
Daher wurde ausgehend von diesen ermutigenden Ergebnissen erwartet, daß aus Catechinen aus grünem Tee  
30 Antikrebsmedikamente entwickelt würden.

Die große Menge an Untersuchungen, die durch die gegenwärtigen Erfinder durchgeführt wurden, und sich  
auf die pharmakologischen Wirkungen von Bestandteilen aus grünem Tee bezogen, führten zu dem Ergebnis,  
daß Bestandteile aus grünem Tee eine überragende antithrombotische Aktivität besitzen und dies führte zu der  
vorliegenden Erfindung.

35 Daher ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, weitere pharmazeutische Erzeugnisse mit antithromboti-  
scher Aktivität zur Verfügung zu stellen.

Weiterhin ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Herstellung der oben erwähnten  
Erzeugnisse sowie ein allgemeines Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus grünem Tee zur Verfügung zu  
stellen.

40 Die Lösung der Aufgabe erfolgt durch ein pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1. Verfahrenstech-  
nisch erfolgt die Lösung der Aufgabe durch ein Verfahren gemäß Anspruch 9 sowie durch ein Verfahren gemäß  
Anspruch 11.

Das Trennverfahren von Catechinen aus grünem Tee kann in drei Schritte unterteilt werden: 1. Extraktions-  
verfahren, 2. Eliminationsverfahren und 3. Reinigungsverfahren.

45 Das bestehende Extraktionsverfahren wird mit erwärmtem Wasser, gekühltem Wasser, Methanol, Ethanol  
oder einer geeigneten Mischung daraus durchgeführt. In dem Verfahren zur Eliminierung von anderen Bestand-  
teilen außer den Wirkbestandteilen, werden hochpolare Lösungsmittel, wie z. B. Chloroform, Ethylacetat oder  
Diethylether, welches organische Lösungsmittel sind, die sich nicht mit Wasser mischen, verwendet, um die  
Eliminierungswirkung zu maximieren. Zur endgültigen Reinigung wird ein Verteilungsextraktionsverfahren  
50 verwendet, dessen Hauptwirkungsweise auf der unterschiedlichen Polarität des organischen Lösungsmittels  
beruht. Heutzutage werden die Verfahren der Säulenchromatographie und Hochgeschwindigkeitsflüssigchroma-  
tographie für das Reinigungsverfahren verwendet. Das Reinigungsverfahren durch die Verteilungsextrak-  
tionsmethode wird von einigen Problemen begleitet, wie z. B. Zeitverzögerung für Aufbau, hohe Unterhaltsko-  
sten und Gefahr bei der Handhabung von organischen Lösungsmitteln wie Chloroform, Methylisobutylketon  
55 usw. Bei dem chromatographischen Verfahren werden verbreitet Sephadex oder Polymere für das Verfahren  
benutzt, aber dieses Reinigungsverfahren benötigt weitere Verbesserungen, dahingehend, daß seine Extrak-  
tionsbedingungen komplex und zeitaufwendig sind und viel Arbeitskraft benötigen. Auf der anderen Seite zeigt  
die Reinigungsmethode durch Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie eine zeitsparende Wirkung und  
eine stärkere Reinigungseffizienz, jedoch sind das System und das Elutionslösungsmittel teuer, und es ist  
60 möglich, daß die Trennsäule leicht reißt.

Um die obigen Probleme zu lösen, haben die gegenwärtigen Erfinder eine breite Forschung mit verschiedenen  
Methoden durchgeführt. Als Ergebnis davon waren die gegenwärtigen Erfinder in der Lage, den Rückstand des  
hydrothermalen Extraktes durch Zentrifugation insgesamt abzutrennen, und durch Verwendung einer Sephadex  
LH-20 Säule zur Chromatographie und einem Lösungsmittel zur vereinfachten Trennung, sowohl Terpenoide  
65 als auch Farbbestandteile, wie auch wasserlösliches Koffein, freie Aminosäuren, und Saccharide durch einmaliges  
Spülen mit einer 15%igen Lösungsmischung aus Wasser-Aceton oder Dioxan zu reinigen. Daher muß eine  
zusätzliche Koffeineliminierung nach dem etablierten Verfahren in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung  
nicht durchgeführt werden, und weiterhin konnte das Hinzukommen von Verunreinigungen, welche aus dem

organischen Lösungsmittel stammten oder jenen, die in dem Endprodukt gefunden wurden, durch die Verwendung von Chloroform, Methylisobutylketon usw. wirklich verhindert werden. Als Ergebnis wird nur der gelbrote Anteil auf die obere Schicht der Chromatographiesäule aufgebracht und kann leicht mit dem bloßen Auge beobachtet werden. Auf der anderen Seite können aktive Bestandteile aus dem Rest des gelbroten Anteils in einer maximalen Ausbeute erhalten werden, indem gleichzeitig mit einer 60%igen Lösungsmittelmischung aus Wasser-Aceton oder Dioxan eluiert wird. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist genauer als die etablierten Verfahren. Auf der Grundlage dieser Funde wurde die vorliegende Erfindung durch wiederholte breite Forschung vervollständigt.

Im ersten Schritt der Verfahren der vorliegenden Erfindung wurde grüner Tee mit erwärmtem Wasser extrahiert. Bei dem Konzentrationsverfahren wurde sichergestellt, daß im Hinblick auf die antioxidierenden Wirkungen der Wirkbestandteile ca. 1/4 an n-Butanol zu dem Extrakt zugegeben wurde. Während des Konzentrationsverfahrens wurde die Kapazität von n-Butanol zu jeder Zeit während der Extraktion aufrecht erhalten, um den Extrakt so daran zu hindern, von der Luft oxidiert zu werden, indem er an die Oberfläche exponiert wird. In der Zwischenzeit wurde ein Konzentrationsvorgang der zuletzt hergestellten Wirkbestandteile durch Gefriertrocknung durchgeführt. Als Ergebnis wurde Wasser vollständig eliminiert, wobei gleichzeitig das Zusammensetzungsverhältnis zwischen Konzentrat und Wirkbestandteilen nach dem Gefriertrocknen kaum verändert war.

Das getrocknete Pulver der Wirkbestandteile war gelbbraun, sehr löslich in Wasser und über sechs Monate stabil, da es nicht hygroscopisch war. Daher konnte das getrocknete Pulver leicht zu pharmazeutischen Erzeugnissen verarbeitet werden.

Als ein Ergebnis von wiederholter Prüfung des oben erwähnten Verfahrens, enthielt jede Charge ein konstantes Zusammensetzungsverhältnis der Wirkbestandteile.

Nach Klassifizierung der Zusammensetzung der aktiven Fraktion war das Zusammensetzungsverhältnis wie folgt: 30% Polyphenole, 60% einer Mischung aus Epigallocatechingallat und Epicatechin und die kleine Menge von 6% Epigallocatechin.

Das allgemeine Extraktionsverfahren von Extrakten aus grünem Tee in der vorliegenden Erfindung wird nun detaillierter in Bezug auf jede der folgenden Methoden beschrieben werden.

#### Extraktion

Im ersten Schritt werden getrocknete grüne Teeblätter oder gerösteter Tee als Ausgangsmaterial zehn Minuten lang mit erwärmtem Wasser in dem Bereich von 70–90°C extrahiert. Vorzugsweise wird die Extraktion ohne Kochen unter Rühren beendet. Unlösliche Materialien aus dem Extrakt werden mit einem gut bekannten Verfahren wie Filtration unter erhöhtem Druck, Vakuumfiltration oder Filtration durch Zentrifugation behandelt.

Erwärmtes Wasser für die Extraktion kann gewöhnlich in einer Menge von 5 bis 100 mal des Gewichtes an grünem Tee eingesetzt werden, während 10 bis 30 mal des Gewichts an grünem Tee die besten Ergebnisse erzielen. Der Anteil von Extraktionslösungsmittel in erwärmtem Wasser, welcher verwendet werden könnte, liegt bei Mischen in alkoholischem Lösungsmittel in dem Bereich von 5–50%. Obwohl die Extraktionsdauer von der Temperatur abhängt, beträgt sie normalerweise von 30 Sekunden bis zu einer Stunde, oder bevorzugt von 5 Minuten bis 20 Minuten.

#### Konzentrierung unter vermindertem Druck

Wenn erwärmtes Wasser als das Extraktionslösungsmittel benutzt wurde, wurden 10–50% (v/v) n-Butanol, bevorzugt 20%, zu dem erhaltenen Extrakt zugegeben und dieser Zustand wurde beibehalten, bis der Konzentrationsschritt unter vermindertem Druck beendet war, um ein Kochen des Extraktes zu verhindern, und einen direkten Kontakt der Wirkbestandteile in dem Extrakt mit Luft durch das an der Oberfläche des Extraktes vorliegende n-Butanol zu blockieren, mit dem Ziel, eine Änderung der Zusammensetzung der Wirkbestandteile zu verhindern.

Die Konzentrierung wurde mit Erwärmen unter vermindertem Druck in dem Bereich von ca. 10–70 mmHg, z. B. bei ungefähr von 50°C bis 70°C durchgeführt, um ein viskoses Extrakt (mit einem Gehalt an Wasser von ca. 10% bis 30% (w/w)) zu erzeugen.

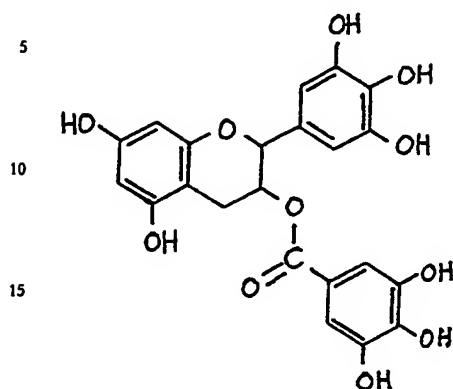
Die Zeitdauer für die Konzentrierung bei vermindertem Druck hängt von den Bedingungen des verminderten Drucks ab, aber es dauert von ca. 30 Minuten bis zu 2 Stunden. Bei dem Verfahren der Konzentrierung unter vermindertem Druck sollte die Temperatur nicht über 90°C liegen, um einen Verlust oder eine Zerstörung der Wirkbestandteile in dem Extrakt zu verhindern.

#### Gefriertrocknung

Die gereinigte Flüssigkeit von der Säule wird durch eine Konzentrierung unter vermindertem Druck bei Raumtemperatur ohne Erwärmen konzentriert und wird schnell eingefroren und gelagert. Gefriertrocknung kann Sublimat und restliches Wasser vollständig eliminieren, indem die Probe bei extrem niedrigen Temperaturen unter Verwendung eines unterhalb von –100°C kühlenden Mittels unter Vakuumbedingungen aufbewahrt wird. Die Zeitdauer zum Trocknen hängt von der Menge der Probe, der Oberfläche, der Temperatur des Kühlmittels und der Kapazität der Vakuumpumpe ab, aber vollständig getrocknetes Material kann innerhalb von 12 bis 24 Stunden erhalten werden.

Getrocknetes Pulver, welches durch das obige Verfahren erhalten wurde, enthält Epigallocatechingallat

(EGCG), einen der Wirkbestandteile von grünen Teeblättern, dargestellt durch die folgende Formel:



in dem Verhältnis von ca. 50—70% (w/w) in dem Extrakt.

Da das hier erhaltene trockene Pulver nicht hygroskopisch ist, und ein geringes spezifisches Volumen hat, ist es möglich, pharmazeutische Erzeugnisse in Form von Pulver, Granulat, feinem Granulat oder Tabletten durch gut bekannte Verfahren herzustellen.

Außerdem ist das erhaltene trockene Pulver wenig giftig und kann durch orale Verabreichung appliziert werden. Das getrocknete Pulver kann zu pharmazeutischen Erzeugnissen, wie z. B. Kapsel, Pulver, Granulat, Mikrogranulat, Weichkapsel und Flüssigkeit, in Verbindung mit pharmazeutisch annehmbaren Vehikeln (z. B. Stärke, Lactose, Calciumcarbonat, Calciumphosphat usw.), Bindemitteln (z. B. Stärke, Gummi arabicum, Carboxymethylcellulose, Hydroxymethylcellulose, kristalline Cellulose usw.), Gleitmitteln (z. B. Magnesiumstearat, Talkum usw.), Trennmitteln (z. B. Carboxymethylcellulosecalcium, Talkum, synthetisches Aluminiumsilikat usw.), Verdünnungsmitteln (z. B. Wasser, Pflanzenöl usw.) verarbeitet werden.

Weitere Vorteile und Merkmale der vorliegenden Erfindung ergeben sich aufgrund der Beschreibung von Ausführungsbeispielen sowie anhand der Zeichnung.

Es zeigen:

Fig. 1—4 Diagramme, welche die antithrombotischen Wirkungen des antithrombotischen Mittels der vorliegenden Erfindung auf die Agglutination, welche durch ADP, Adrenalin (Epinephrin), Collagen bzw. Ristocetin als Agglutinationsauslöser induziert wird, vergleichen,

Fig. 5 ein Diagramm, welches die antithrombotischen Wirkungen des antithrombotischen Mittels der vorliegenden Erfindung auf die Agglutination zeigt, wenn Adrenalin und Collagen zusammen damit verabreicht wurden,

Fig. 6 ein Diagramm, welches die Blutungszeiten zeigt, wenn das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung und Aspirin als eine Kontrolle verabreicht wurden,

Fig. 7 ein Diagramm, welches die gesamten Blutgerinnungszeiten zeigt, wenn das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung und Aspirin als eine Kontrolle verabreicht wurden, und

Fig. 8 ein Diagramm, welches die Plasmagerinnungszeiten zeigt, wenn das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung und Aspirin als eine Kontrolle verabreicht wurden.

Die folgenden Beispiele definieren nicht die vorliegende Erfindung, erklären diese aber in größerem Detail.

#### Beispiel 1

200 g getrocknete grüne Teeblätter, gerösteter Tee oder grüner Instanttee wurden von 70°C—90°C mit 4000 ml erwärmtem Wasser 20 min lang extrahiert. Der erhaltene Extrakt wurde durch Filterpapier filtriert, um die unlöslichen Bestandteile davon abzutrennen. Es wurde dann wieder durch Zentrifugation bei 2000 rpm 10 min lang abgeschieden.

Das Filtrat (ca. 3500 ml) wurde gesammelt und unter vermindertem Druck bei 70°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um 400 ml Extrakt zu erhalten. Die 400 ml Extrakt wurden in 400 ml Chloroform gelöst, um die nichtpolaren Bestandteile vollständig zu entfernen. Der oben erwähnte Extraktions-Entfernungsschritt wurde mehr als dreimal wiederholt. Die wäßrige Phase wurde mit 400 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, um eine organische Lösungsmittelschicht von ca. 1200 ml zu erhalten und dann wurde das erhaltene Material bei 50°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer vollständig auf 50 ml konzentriert. 200 ml Aceton oder Dioxan wurden zu dem Konzentrat zugegeben und es wurde wieder auf 20 ml konzentriert. 20 ml des Konzentrats wurden auf eine Sephadex LH-20 Säule (Innendurchmesser 35 mm, Länge 550 mm, Sephadex Nettogewicht 200 g) aufgetragen. Zuerst wurde mit 3000 ml Wasser-Aceton oder Wasser-Dioxan (84 : 15, v/v) gespült bis die gelbgrüne oder braungefärbte Phase vollständig eluiert ist, und dann wird eine Elution mit Wasser-Aceton oder Wasser-Dioxan-Lösung (40 : 60, v/v) begonnen. Wenn das gelbbraune oder gelbe Band, welches auf der oberen Schicht der Säule absorbiert war, von dem oberen Ende der Säule zu eluieren beginnt, werden die Fraktionen gesammelt und bei 70°C mit einem Vakuumverdampfungstrockner auf 50 ml konzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht bei unter -20°C gelagert und mit einem Gefriertrockner getrocknet, um 8,6 g an getrocknetem

## DE 44 32 549 A1

Pulver (Rückstandsanteil von EGCG : 70%) zu erhalten.

Der Rückstandsanteil von EGCG in getrocknetem Pulver kann durch die folgende Gleichung berechnet werden:

$$\text{Anteil von EGCG (\%)} = \text{Peakfläche mit EGCG / Gesamtpeakfläche} \times 100$$

5 mg des getrockneten Pulvers, welches durch die obigen Verfahren gewonnen wurde, wird in 5 mg Methanol gelöst und 5 µl der resultierenden Lösung werden in eine Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie eingespritzt, um den Gehalt an EGCG zu messen.

Bedingungen für die Messung durch Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatographie:

Gerät: Hochgeschwindigkeitsflüssigchromatograph (P-6300, Hitachi, Japan)

Elutionsmittel: Lösungsmittelmischung aus Acetonitril-Ethylacetat-0,05% Phosphorsäure (12 : 2 : 86, v/v/v)

Säule: Cosmosil 5C18 (4,6 mm Innendurchmesser x 150 mm Länge) (Nakalai Tesque Co., Japan)

Säulentemperatur: 40°C

Wellenlänge: 280 nm

Unter den obigen Bedingungen beträgt die Rückhaltezeit von EGCG 6,9 min. Als das Ergebnis der obigen Messung beträgt der Rückstandsanteil von EGCG 70%. Die Rückstandsanteile von EGCG in getrocknetem Pulver, welche in den Beispielen 2 bis 6 erhalten wurden, werden mit demselben Verfahren wie oben beschrieben gemessen.

### Beispiel 2

1,5 kg getrocknete grüne Teeblätter, gerösteter grüner Tee oder grüner Instanttee werden bei 70°C 20 min lang mit 20 l einer Lösungsmischung aus Wasser-Ethanol (90:10, v/v) extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird durch Papierfilter filtriert und die unlöslichen Bestandteile werden abgetrennt. Das Filtrat (ca. 19,0 l) wird gesammelt und unter vermindertem Druck bei 70°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um ein viskoses Extrakt zu erhalten. Das viskose Extrakt wird in 2,0 l heißem Wasser gelöst, diese werden zu 500 ml Portionen aliquotiert und mit 500 ml einer Lösungsmittelmischung aus Chloroform-n-Hexan (80 : 20, v/v) extrahiert, um nichtpolare Bestandteile vollständig zu entfernen. Der obige Extraktions-Entfernungsschritt wird mehr als dreimal wiederholt. Die wäßrige Schicht wird mit 500 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, um eine organische Schicht von ca. 1,5 l zu erhalten, und vollständig bei 50°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. 500 ml Aceton werden zu dem getrockneten Material hinzugegeben und es wird auf 50 ml konzentriert. 50 ml des Konzentrats werden auf das obere Ende einer Sephadex LH-20 Säule (Innendurchmesser 70 mm x Länge 500 mm, Sephadex Nettogewicht 400 g) aufgetragen. Nach Entfernen des löslichen Materials mit 4,0 l Wasser, wird zuerst mit 3,0 l Wasser-Aceton-Lösung (70 : 30, v/v) gespült, bis die gelbgrüne oder braungefärbte Phase vollständig eluiert ist, und dann wird begonnen, mit Wasser-Aceton-Lösung (40 : 60, v/v) zu eluieren. Wenn das gelbbraune oder gelbe Band, welches an der oberen Schicht der Säule absorbiert war, beginnt von dem oberen Ende der Säule zu eluieren, werden die Fraktionen gesammelt und bei 70°C mit einem Vakuumverdampfungstrockner auf 100 ml konzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht bei unter -20°C gelagert und mit einem Gefriertrockner getrocknet, um 43,8 g getrocknetes Pulver (Rückstandsanteil von EGCG : 54%) zu erhalten.

### Beispiel 3

200 g getrocknete Blätter von grünem Tee, gerösteter grüner Tee oder grüner Instanttee werden 20 min lang bei 70°C bis 90°C mit 4 l heißem Wasser extrahiert. Das erhaltene Extrakt wird durch Filterpapier filtriert und von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt, und das Filtrat wird 10 min lang bei 2000 rpm zentrifugiert, um die ausgefallenen Rückstände zu entfernen. Das obere Filtrat (ca. 3,5 l) wird gesammelt und unter vermindertem Druck bei 70°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um 400 ml Extrakt zu erhalten. Die wäßrige Phase wird mit 400 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, um eine organische Phase von ca. 1,2 l zu erhalten und die organische Phase wird bei 50°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer vollständig bis auf 50 ml getrocknet. 200 ml Isopropanol werden zu dem getrockneten Material zugegeben und auf 20 ml konzentriert. 20 ml des Konzentrates werden auf eine Sephadex LH-20 Säule (Innendurchmesser 35 mm x Länge 550 mm, Sephadex Nettogewicht 200 g) aufgetragen. Zuerst wird mit 3,0 l Wasser-Aceton-Lösung (85 : 15, v/v) Lösung gespült, bis die gelbgrüne oder braungefärbte Phase vollständig eluiert ist, und dann wird begonnen, mit 5,0 l Wasser-Aceton-Lösung (55 : 45, v/v) zu eluieren. Wenn das gelbbraune oder gelbe Band, welches an die obere Schicht der Säule absorbiert war, vom oberen Ende der Säule zu eluieren beginnt, werden die Fraktionen gesammelt und bei 70°C mit einem Vakuumverdampfungstrockner auf 50 ml konzentriert. Die Sephadex LH-20 Säule kann wiederverwendet werden, indem die restlichen nichtpolaren Materialien auf der Säule mit 2,0 l Aceton eluiert werden. Das Konzentrat wird über Nacht bei unter -20°C gelagert und mit einem Gefriertrockner getrocknet, um 14,7 g getrocknetes Pulver (Rückstandsanteil von EGCG : 62%) zu erhalten.

### Beispiel 4

100 g getrocknete Blätter von grünem Tee, gerösteter grüner Tee, oder grüner Instanttee werden 10 min lang bei 70°C bis 90°C mit 1,0 l heißem Wasser extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird durch Filterpapier filtriert und die unlöslichen Bestandteile werden abgetrennt. Der Niederschlag wird durch 10 min Zentrifugation bei 2000

rpm entfernt. Das obere Filtrat (ca. 800 ml) wird gesammelt und unter vermindertem Druck bei 70°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um 100 ml Extrakt zu erhalten. Die wäßrige Phase wird mit 100 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, um eine organische Phase von ca. 280 ml zu erhalten, und bei 50°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer vollständig getrocknet, um in einen viskosen Zustand überführt zu werden. 150 ml Methanol werden zu dem getrockneten Material zugegeben und auf 15 ml konzentriert. 15 ml Konzentrat werden auf das obere Ende einer Sephadex LH-20 Säule (Innendurchmesser 35 mm x Länge 550 mm, Sephadex Nettogewicht 200 g) aufgetragen. Zuerst wird mit 4,0 l Wasser-Aceton-Lösung (85 : 15, v/v) Lösung gespült, bis die gelbgrüne oder braungefärbte Phase vollständig eluiert ist, und dann wird begonnen, mit Wasser-Aceton-Lösung (30 : 70, v/v) zu eluieren. Wenn das gelbbraune oder gelbe Band, welches an der oberen Schicht der Säule absorbiert ist, von dem oberen Ende der Säule zu eluieren beginnt, werden die Fraktionen gesammelt und bei 70°C mit einem Vakuumverdampfungstrockner auf 30 ml konzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht bei unter -20°C gelagert und mit einem Gefriertrockner getrocknet, um 5,5 g getrocknetes Pulver (Rückstandsanteil von EGCG: 58%) zu erhalten.

#### 15 Beispiel 5

200 g getrocknete Blätter von grünem Tee, gerösteter grüner Tee, oder grüner Instanttee werden bei 70°C bis 90°C 20 min lang mit 4 l heißem Wasser extrahiert. Der erhaltene Extrakt wird durch Filterpapier filtriert und die unlöslichen Bestandteile werden abgetrennt. Der Niederschlag wird durch 10 min Zentrifugation bei 2000 rpm entfernt. Das Filtrat (ca. 3,5 l) der oberen Schicht wird gesammelt und unter vermindertem Druck bei 70°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um 400 ml Konzentrat zu erhalten. Die wäßrige Phase wird mit 400 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, um eine organische Phase von ca. 1,2 l zu erhalten, und bei 50°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer vollständig getrocknet, um 50 ml Konzentrat zu erhalten. 200 ml Methanol werden zu dem getrockneten Material zugegeben und es wird auf 20 ml konzentriert. 20 ml Konzentrat werden auf das obere Ende einer Sephadex LH-20 Säule (Innendurchmesser 35 mm x Länge 550 mm, Sephadex Nettogewicht 200 g) aufgetragen. Zuerst wird mit 2,5 l Wasser-Isopropanol-Lösung (90 : 10, v/v) gespült, bis die gelbgrüne oder braungefärbte Phase vollständig eluiert ist, und dann wird begonnen, mit 5,0 l Wasser-Isopropanol-Lösung (50 : 50, v/v) zu eluieren. Wenn das gelbbraune oder gelbe Band, welches auf der oberen Schicht der Säule absorbiert war, von dem oberen Ende der Säule zu eluieren beginnt, werden die Fraktionen gesammelt und bei 70°C mit einem Vakuumverdampfungstrockner auf 40 ml konzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht bei unter -20°C gelagert und mit einem Gefriertrockner getrocknet, um 10,2 g getrocknetes Pulver (Rückstandsanteil von EGCG: 70%) zu erhalten.

#### Beispiel 6

200 g getrocknete Blätter von grünem Tee, gerösteter grüner Tee, oder grüner Instanttee werden bei 40°C bis 65°C 60 min lang mit 4,0 l einer Wasser-Methanol-Lösung (5 : 50, v/v) extrahiert. Das erhaltene Extrakt wird durch Filterpapier filtriert und von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt. Der Niederschlag wird durch 10 min Zentrifugation bei 2000 rpm abgetrennt. Das Filtrat (ca. 3000 ml) wird gesammelt und unter vermindertem Druck bei 70°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um einen vollständig getrockneten Extrakt zu erhalten. Das getrocknete Material wird in 500 ml Wasser-Methanol-Lösung (80 : 20, v/v) gelöst, mit 400 ml Ethylacetat dreimal extrahiert, um eine organische Phase von ca. 1200 ml zu erhalten, und bei 50°C mit einem Vakuumrotationsverdampfer konzentriert, um ein Konzentrat von 50 ml zu erhalten. 200 ml Dioxan werden zu dem Konzentrat zugegeben und es wird wieder auf 20 ml konzentriert. 20 ml Konzentrat werden auf das obere Ende einer Sephadex LH-20 Säule (Innendurchmesser 35 mm x Länge 550 mm, Sephadex Nettogewicht 200 g) aufgetragen. Als erstes wird mit 3,0 l einer Wasser-Dioxan-Lösung (85 : 15, v/v) gespült, bis die gelbgrüne oder braungefärbte Phase vollständig eluiert ist, und dann wird begonnen, mit einer Wasser-Dioxan-Lösung (40 : 60, v/v) zu eluieren. Wenn das gelbbraune oder gelbe Band, welches an der oberen Schicht der Säule absorbiert war, von dem oberen Ende der Säule zu eluieren beginnt, werden die Fraktionen gesammelt und bei 70°C mit einem Vakuumverdampfungstrockner auf 50 ml konzentriert. Das Konzentrat wird über Nacht bei unter -20°C gelagert und mit einem Gefriertrockner getrocknet, um 7,8 g getrocknetes Pulver (Rückstandsanteil von EGCG: 55%) zu erhalten.

Die Plättchen-Antiagglutinationsaktivität wird mit der oben erhaltenen Fraktion gemessen. Die Blutgerinnung wird allgemein in primäre Hämostase durch die Wirkung von Plättchen, Wirkbestandteilen im Blut, und sekundäre Hämostase durch Einbeziehung von Plasma, außer Plättchen, unterteilt. Unter anderem ist es nützlich, als ein grundlegendes Heilverfahren ein Inhibitionsmittel der primären Hämostase zu entwickeln, um eine Thrombogenese oder Blutgerinnung zu verhindern.

Gerösteter Tee in der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf halbverarbeitete Waren, welche vorgefertigt sind, bevor sie durch feines Schneiden der getrockneten Blätter des grünen Tees zu dem endgültigen grünen Tee verarbeitet werden.

#### Versuchsbeispiel

##### Auswirkungen auf die primäre Hämostase

#### 65 1. Versuch zur Inhibition der Plättchenagglutination

Anti-agglutinative Wirkungen auf Plättchen werden durch das Trübungsmeßverfahren von Born, unter Ver-



wendung eines Aggreccorder II PA-3220 (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Ltd.) gemessen. Das Prinzip des Verfahrens ist es, daß ein Plasma, welches reich an Plättchen ist (PRP), hergestellt wird, bei welchem die Plättchenmenge in dem Bereich von 200 000—400 000/mm<sup>3</sup> eingestellt ist, Agglutinationsauslöser (ADP, Adrenalin, Collagen, Ristocetin) dort hinzugegeben werden, und die Änderung der optischen Dichte aufgrund der Agglutination aufgezeichnet wird. Blut wird von einer gesunden Person, welche eine normale Plättchenkapazität hat, abgenommen und in Röhrchen mit 3,8% Natriumcitrat als Antigerinnungsmittel, in einem Verhältnis von 1:9, verteilt. Eine Zentrifugation wird 10 min lang bei 160 G (1000 rpm) durchgeführt, um PRP zu erhalten, bei welchem die Plättchenmenge in dem Bereich von 200 000—400 000/mm<sup>3</sup> eingestellt ist. Eine erneute Zentrifugation wird 10 min lang bei 2000 G (3400 rpm) durchgeführt, um plättchenarmes Plasma (PPP) zu erhalten. Ein Aggreccorder II PA-3220 wird für die Messung verwendet (37°C, 1000 rpm, Korrektur mit plättchenarmem Plasma). Nachdem sie in das Meßgerät transferiert wurden, wurden das an Plättchen reiche Plasma und die Versuchsprobe wie sie waren von 3 bis 5 min lang so belassen, und dann wurden Auslöser der Plättchenagglutination dort hinzugegeben und der Agglutinationsprozeß wurde 10 min lang gemessen. ADP, Adrenalin, Collagen und Ristocetin wurden als Auslöser der Plättchenagglutination verwendet.

Als ein Ergebnis des obigen Versuchs zeigt der Extrakt aus grünem Tee seine starke Unterbindung der Plättchenagglutination bei Auslösern in der Konzentration von 1 mg/ml. Die Auswirkungen der Antiagglutination zeigten sich in Inhibitionen von 60% mit ADP, 96,5% mit Adrenalin, 35,5% mit Collagen und 36,5% mit Ristocetin. Auf der anderen Seite zeigte Aspirin (0,1 mM) als Kontrolle 13,5% mit ADP, 79,5% mit Adrenalin, 72,6% mit Collagen und keine mit Ristocetin.

Fig. 1 zeigt ein Diagramm von Antiagglutinationswirkungen, wenn ADP als Agglutinationsauslöser und das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung injiziert werden.

Fig. 2 zeigt ein Diagramm von Antiagglutinationswirkungen, wenn Adrenalin als Agglutinationsauslöser und das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung injiziert werden.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm von Antiagglutinationswirkungen, wenn Collagen als Agglutinationsauslöser und das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung injiziert werden.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm von Antiagglutinationswirkungen, wenn Ristocetin als Agglutinationsauslöser und das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung injiziert werden.

Als Ergebnis des Versuchs wurde bewiesen, daß das antithrombotische Mittel der vorliegenden Erfindung starke Auswirkungen auf die Antiagglutination der Plättchen besitzt.

## 2. Messung der antithrombotischer Aktivität

Die Induktion eines Versuchsthrombus wird auf der Grundlage des Verfahrens von Dimino et al. durchgeführt. Männliche ICR Ratten mit einem Gewicht von 20—30 g werden in dem Versuch verwendet. Die Induktion des Thrombus wird ausgelöst, indem ein Auslöser der Plättchenagglutination (Adrenalin, Collagen) in die Schwanzvene der Ratte injiziert wird, und der Thrombus bildet sich schnell in einer Kapillare. Beschleunigungsmaterialien für die Agglutination werden, in diesem Experiment durch Mischen von 15 µl Collagen, 400 mM Adrenalin und 100 µl einer physiologischen Salzlösung hergestellt. Diese wird mit 100 µl pro 20 g Rattengewicht in die Schwanzvene der Ratte injiziert. 2 Stunden vor dem Start des Versuchs werden je 100 mg davon und 10 mg der Versuchsprobe pro kg Rattengewicht injiziert, um die antithrombotischen Wirkungen von Extrakten aus grünem Tee herauszufinden. Das Gesamtvolumen der Injektion sollte nicht über 0,4 ml liegen. Die Antithrombosewirkungen der Extrakte aus grünem Tee werden berechnet durch den Prozentsatz an überlebenden Ratten, die vor dem Tod oder der Paralyse der Hinterbeine bewahrt wurden, welche durch eine Injektion des Auslösers der Plättchenagglutination auftreten kann. Die hier verwendete Definition der Paralyse beruht auf der Grundlage des Verlustes der Hinterbeinbewegungsfähigkeit über 15 min oder bei kontinuierlichem Schütteln.

Bei dem Versuch das geeignete Volumen für eine Thrombusinduktion mit Adrenalin und Collagen herauszufinden, konnte die Mischung aus 15 µg Collagen, 400 µM Adrenalin und 100 µl physiologischer Salzlösung bei diesem Versuch zu 95% einen Thrombus induzieren. Ob ein Thrombus gebildet wurde oder nicht, wurde durch den Tod oder die Paralyse der Hinterbeine über 15 min durch Injektion des Auslösers der Plättchenagglutination bestimmt. Die Paralyse der Hinterbeine wurde anhand der Merkmale von sowohl Kriechen als auch Zittern gemessen. Wenn 100 mg/kg Extrakte aus grünem Tee in die Bauchhöhle induziert wurden, zeigt sich eine 66%ige Schutzwirkung, und wenn 10 mg/kg injiziert wurden, eine 44%ige Schutzwirkung. Auf der anderen Seite zeigte Aspirin (100 mg/kg) als Kontrolle eine 45%ige Schutzwirkung.

Fig. 5 zeigt ein Diagramm der antithrombotischen Wirkungen, wenn Adrenalin und Collagen als Agglutinationsauslöser verabreicht wurden, und dann die Verabreichung eines Antithrombosemittels der vorliegenden Erfindung folgte.

Mit diesem Versuch wurde bewiesen, daß das Antithrombosemittel der vorliegenden Erfindung starke antithrombotische Wirkungen hat, welche denen des Aspirins bei nur einem Zehntel der Menge des Aspirins entsprechen.

## 3. Versuch zur Blutgerinnung

### (1) Bestimmung der Blutungsdauer

Männlichen Sprague-Dawley Ratten, die von 180—200 g wiegen, wird das Versuchsmaterial einmal pro Tag 10 Tage lang verabreicht. Die Ratte wird durch eine intraperitoneale Injektion von Natriumpentobarbitalösung (400 mg/kg) betäubt. Der Schwanz der betäubten Ratte wird in einer Länge von 5 mm vom Ende aus aufgeschnitten und der aufgeschnittene Schwanz wird bei 37,5°C bis zu 5 cm in eine Salzlösung getaucht. Die

Zeitdauer vom Aufschneiden des Schwanzes bis zur Hämostase wird gemessen.

Als Ergebnis dieses Versuchs wurde die Blutungsdauer abhängig von dem verabreichten Volumen vergrößert:  $113,2 \pm 19,6$  s bei 10 mg/kg,  $250,7 \pm 117,3$  s bei 100 mg/kg,  $509,8 \pm 1,6$  s bei 300 mg/kg in der Versuchsgruppe, verglichen mit  $65,0 \pm 12,9$  s in der Kontrollgruppe.

Im Fall der Verabreichung von Aspirin (100 mg/kg) lag sie über der Kontrollgruppe bei  $165,1 \pm 34,3$  s. Die Ergebnisse sind in Fig. 6 gezeigt. Diese zeigt ein Diagramm der Blutungsdauer, wenn das Antithrombosedmittel der vorliegenden Erfindung und Aspirin als Kontrolle verabreicht werden.

## (2) Bestimmung der gesamten Blutgerinnungszeit

Am nächsten Tag nach der Bestimmung der Blutungsdauer wird die Ratte durch Ether betäubt, und 4,5 ml Blut werden mit einer Plastikspritze, welche 0,5 ml einer 3,13%igen Natriumcitratlösung enthält, aus ihrem Herz entnommen. Das entnommene Blut wird vorsichtig in der Spritze gemischt, 1 ml Blut wird in ein Glasteströhrchen gegeben, wobei 1,7%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (200  $\mu\text{l}$ ) dazugegeben werden, und unter Rühren wird die Zeitdauer der Bildung der Koagulation bei Raumtemperatur gemessen.

Als Ergebnis dieses Versuchs war die gesamte Blutgerinnungszeit abhängig von dem verabreichten Volumen verlängert:  $130,1 \pm 20,5$  s bei 10 mg/kg,  $140,9 \pm 14,2$  s bei 100 mg/kg,  $150,6 \pm 17,6$  s bei 300 mg/kg in der Versuchsgruppe, verglichen mit  $109,4 \pm 14,0$  s in der Kontrollgruppe. Außerdem benötigte Aspirin (100 mg/kg) als Kontrolle  $137,2 \pm 19,4$  s. Die Ergebnisse sind in Fig. 7 gezeigt, welche ein Diagramm der gesamten Blutgerinnungszeit zeigt, wenn das Mittel der vorliegenden Erfindung und Aspirin verabreicht wurden.

## (3) Bestimmung der Plasmagerinnungszeit

Plasma wird aus dem in dem obigen Versuch gesammelten Blut durch Zentrifugation bei 25 000 rpm erhalten. Eine vereinigte Probe mit 100  $\mu\text{l}$  Plasma und 50  $\mu\text{l}$  einer 50 mM  $\text{CaCl}_2$  Lösung wird bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Teströhrchen geschüttelt. Die verstrichene Zeit vom Zugeben des  $\text{CaCl}_2$  bis zum Beobachten des Gerinnsels wird gemessen.

Als Ergebnis dieses Versuchs wurde die Plasmagerinnungsdauer abhängig von dem verabreichten Volumen vergrößert:  $177,5 \pm 37,6$  s bei 10 mg/kg,  $219,8 \pm 57,9$  s bei 100 mg/kg,  $233,1 \pm 83,2$  s bei 300 mg/kg in der Versuchsgruppe und  $146,2 \pm 26,5$  s bei der Kontrolle. Im Fall von Aspirin (100 mg/kg) als Kontrolle, dauerte es  $222,5 \pm 40,2$  s. Die Ergebnisse sind in Fig. 8 gezeigt. Diese zeigt ein Diagramm der Plasmagerinnungszeit, wenn das Mittel der vorliegenden Erfindung und Aspirin injiziert wurden.

## 4. Inhibition der Lipidhydroxidation und der Enzymaktivität im Plasma

### a) Bestimmung von Inhibitionswirkungen bei der Malondialdehyd (MDA)-Herstellung

1 ml einer Plättchenaufschwemmungslösung wird zu einer isotonischen Lösung eines Extraktes aus grünem Tee (Endkonzentration 1 mg/ml) zugegeben, und dazu werden  $\text{Ca}^{++}$  und Collagen zugegeben. Danach werden zu der resultierenden Mischung 2 ml TBA zugegeben, gefolgt von Erwärmen für 20 min bei  $90^\circ\text{C}$ , dann wird es auf Raumtemperatur abgekühlt und 10 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert. Die optische Dichte der roten Lösung, welche sich im oberen Teil der präzipitierten Plättchen befindet, wird bei 535 nm gemessen, und die Menge an produziertem MDA wird aufgrund des molaren Absorptionsindex des MDA-TBA Konjugates von  $1,56 \times 10^5$  berechnet, wodurch die inhibitorische Wirkung des Extraktes aus grünem Tee gegenüber der Lipidhydroxidation gezeigt wird.

Die Menge an produziertem MDA, welche durch die Reaktion des Sekundärproduktes der Lipidhydroxidation erzeugt wird, kann als ein Kriterium der gesamten Lipidhydroxidation verwendet werden. Extrakte aus grünem Tee zeigten diese Wirkungen in dem gleichen Ausmaß mit Aspirin, welches die Aktivität von Phospholipase A2 Inhibitoren, wie z. B. Primaquin, Chinacrin und Oxygenase inhibiert.

### b) Bestimmung der Aktivität der Abgabe von Arachidonsäure

Ein Extrakt aus grünem Tee (Endkonzentration 1 mg/ml),  $\text{Ca}^{++}$  und Collagen werden zu 1 ml einer Plättchenaufschwemmungslösung zugegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach 30 min werden die Plättchen rasch durch einen Membranfilter abgetrennt und das Filtrat wird unter pH 3 angesäuert. Die resultierende Lösung wird zweimal mit 2 ml Extraktionslösungsmittel (Chloroform : Methylalkohol = 1 : 1, v/v) extrahiert. Die durch Zentrifugation erhaltene untere Chloroformschicht wird in ein anderes Teströhrchen überführt und durch Stickstoffgas getrocknet. Das getrocknete Material wird mit 50  $\mu\text{l}$  Dimethylformamid (DMF) gelöst und zu der resultierenden Lösung werden 50  $\mu\text{l}$  DMF Lösung, welche 12 mM Monodansylcadaverin und 2  $\mu\text{l}$  Diethylphosphorocyanidat enthält, zugegeben, und die resultierende Mischung wird bei Raumtemperatur 15 min lang stehen gelassen, so daß Arachidonsäure mit Fluoreszenz markiert wird.

Die mit Fluoreszenz markierte Arachidonsäure wird mit 50% Methanol : Acetonitril durch ein Elutionsverfahren mit linearem Gradienten auf einer Umkehrphasensäule eluiert und mit einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 520 nm nachgewiesen.

Wie durch die quantitative Bestimmung der Arachidonsäure gezeigt, ist die Änderung der Arachidonsäure durch Extrakte aus grünem Tee geringer als die von Primaquin und Chinacrin. Daher wird angenommen, daß Extrakte aus grünem Tee eine Lipidhydroxidation und eine Plättchenagglutination durch Inhibierung von Cyclooxygenase oder Lipoxygenase, eher als Phospholipase als Wirkbestandteil in den Plättchen verhindern.

## 6. Therapeutische Hyperlipidämiewirkungen — Antiperoxidationswirkung (in vitro)

Der Extrakt aus grünem Tee wird zu einer Lebermikrosomenfraktion (1,5 mg Protein/ml) einer Ratte hinzugegeben, und Cystein (Endkonzentration 500 µM) und Eisensulfat (Endkonzentration 5 µM) werden dazu hinzugegeben und die resultierende Mischung wird 30 min lang bei 37°C inkubiert. 3 ml 10%ige Trichloressigsäure wird dazu hinzugegeben und 2 ml des Überstandes werden nach einer Zentrifugation abgenommen. 0,67% TBA Lösung wird dazu hinzugegeben und die resultierende Lösung wird in kochendem Wasser 15 min lang aktiviert und nach dem Abkühlen wird die optische Dichte gemessen.

## 7. Untersuchungen über eine physiologische Funktionalität — Antihypertoniewirkungen (in vitro)

## Inhibitionenwirkungen gegenüber dem Angiotensin-umwandelnden Enzym (ACE)

ACE ist ein Enzym, welches auf Renin-Angiotensine wirkt, welche eine Schlüsselrolle bei der Steuerung des Blutdrucks, Körperflüssigkeiten und Elektrolyten in vivo spielen. Dieses Enzym wandelt Angiotensin I zu aktivem Angiotensin II um, indem es ein Dipeptid (His—Leu) von dem C-terminalen Ende von ANG I, welches von Renin produziert wird, abspaltet. Das Enzym spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Steuerung des Kreislaufs in einem lebenden Körper, da es ANG II im hypertonen System aktiviert und Bradykinin im hypotonischen System inaktiviert.

Demgemäß kann aufgrund der Inhibitionenwirkung des Extraktes aus grünem Tee auf das Enzym, die Wirkung des Extraktes aus grünem Tee als einem Blutdruck-senkenden Mittel bewiesen werden.

Aspirin ist ein starkes Antikoagulationsmittel, jedoch ist es wegen ernster Magenstörungen unmöglich, es länger einzunehmen. Im Gegensatz dazu wurde von dem antithrombotischen Mittel der vorliegenden Erfindung bewiesen, daß es sowohl keine Nebenwirkungen wie eine Magenstörung zeigt, als auch die gleiche oder sogar eine größere Wirkung wie Aspirin aufweist.

Als das Ergebnis des obigen Versuchs besitzen Extrakte aus grünem Tee gemäß der vorliegenden Erfindung eine herausragende antithrombotische Wirkung.

Daher können Extrakte aus grünem Tee nach der vorliegenden Erfindung als Antithrombosemittel, Thrombogenehemmende Mittel oder Thromboseursache-hemmende Mittel verwendet werden.

## Test der akuten Toxizität

Eine physiologische Salzlösung, welche einen Extrakt aus grünem Tee enthält, wird durch orale und intravenöse Applikation ICR-Ratten verabreicht. Der LD<sub>50</sub>-Wert wird durch die Sterblichkeit nach 72 Stunden berechnet. Die Auswertung erfolgt nach der Up-and-down-Methode. Die Ergebnisse sind wie folgt.

verabreichtes Material	Verabreichungsweg	Anzahl der Tiere	LD <sub>50</sub> mg/kg
Extrakt aus grünem Tee	intravenös	10	500
Extrakt aus grünem Tee	oral	10	1000

Wie nach den obigen Ergebnissen beurteilt, hat das Antithrombosemittel der vorliegenden Erfindung eine geringe akute Toxizität.

Der Extrakt aus grünem Tee gemäß der vorliegenden Erfindung kann von 1,0—2000 mg/kg, von einem bis zu vielen Malen pro Tag, abhängig von Alter, Geschlecht oder Symptomen des Patienten oder dem Zweck der Vorsorge dosiert werden.

Die Extrakte aus grünem Tee gemäß der vorliegenden Erfindung können zu pharmazeutischen Erzeugnissen verarbeitet werden, indem sie mit gewöhnlichen Hilfsstoffen wie z. B. Vehikel, Bindemittel, Gleitmittel, Lösungsmittel, Verdünnungsmittel usw. gemischt werden.

Es folgen Beispiele von Erzeugnissen gemäß der vorliegenden Erfindung.

## Zubereitungsbeispiel 1

## Zubereitung einer Tablette

Extrakte aus grünem Tee	10 mg
Lactose	20 mg
Stärke	20 mg
Magnesiumstearat	geeignete Mengen

Die obigen Bestandteile werden gemäß allgemeinen Herstellungsmethoden von Tabletten zu 50 mg Tabletten verarbeitet.

#### Zubereitungsbeispiel 2

##### Zubereitung von Kapseln

Extrakte aus grünem Tee	100 mg
Lactose	20 mg
Stärke	19 mg
Talkum	1 mg
Magnesiumstearat	geeignete Mengen

Die obigen Bestandteile werden gemäß allgemeinen Herstellungsverfahren von Kapseln in 50 mg Kapseln gefüllt.

#### Zubereitungsbeispiel 3

##### Zubereitung einer Flüssigkeit

Extrakte aus grünem Tee	100 mg
Isomerisierte Saccharide	10 mg
Honig	500 mg
Nikotinsäureamid (amtl. Arzneibuch)	20 mg
Koffeinanhydrid (amtl. Arzneibuch)	30 mg
Natriumbenzoat	70 mg

Die obigen Bestandteile werden gemäß allgemeinen Herstellungsmethoden von Flüssigkeiten zu einer Flüssigkeit gemischt, in braune 100 ml Flaschen gefüllt, abgedichtet und pasteurisiert.

#### Zubereitungsbeispiel 4

##### Zubereitung einer Injektionslösung

Extrakte aus grünem Tee	5 mg
Steriles Wasser	geeignete Mengen

Die obigen Bestandteile werden gemäß allgemeinen Herstellungsverfahren zu einer Injektionslösung verarbeitet und in 2 ml Ampullen gefüllt, abgedichtet und sterilisiert.

#### Zubereitungsbeispiel 5

##### Zubereitung von Weichkapseln

###### 1) Bestandteile zum Füllen

Extrakte aus grünem Tee	10 mg
Polyethylenglycol	230 mg
Glycerin	20 mg

###### 2) Bestandteile für die Trockenhülle (Gew.-%)

Gelatine	52%
Glycerin	32%
Anidrisorb 35/70	12%
Wasser	5%

Die obigen Bestandteile werden gemäß allgemeinen Herstellungsverfahren von Weichkapseln zu Weichkapseln verarbeitet.

## Zubereitungsbeispiel 6

## Zubereitung von Granulat

Extrakte aus grünem Tee	10 mg	5
Lactose	25 mg	

Die obigen Bestandteile werden mit einer Extrusionsgranuliermaschine zu Granulat verarbeitet.

Auf der anderen Seite kann der Extrakt aus grünem Tee gemäß der vorliegenden Erfindung als Zusammensetzung verwendet werden, in welcher der Extrakt aus grünem Tee mit anderen gut bekannten pharmakologischen Materialien, welche unterschiedliche Wirkungen haben, gemischt werden. Solche Zusammensetzungen sind in den Umfang der vorliegenden Erfindung eingeschlossen.

### Patentansprüche

1. Pharmazeutisches Erzeugnis mit Antithromboseaktivität, enthaltend einen Extrakt aus grünem Tee als einen Wirkbestandteil und pharmazeutisch annehmbare Hilfsstoffe, das durch ein herkömmliches Herstellungsverfahren in eine pharmazeutische Form gebracht wurde.
2. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form ein Pulver ist.
3. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form eine Tablette ist.
4. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form eine Kapsel ist.
5. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form eine Flüssigkeit ist.
6. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form eine Weichkapsel ist.
7. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form eine Injektionslösung ist.
8. Pharmazeutisches Erzeugnis gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Form ein Granulat ist.
9. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Erzeugnisses mit Antithromboseaktivität, wobei man einen Extrakt aus grünem Tee als Wirkbestandteil, zusammen mit pharmazeutisch annehmbaren Hilfsstoffen, unter Verwendung eines herkömmlichen Herstellungsverfahrens in eine pharmazeutische Form bringt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man den Extrakt aus grünem Tee dadurch herstellt, daß man getrocknete grüne Teeblätter, gerösteten Tee oder grünen Instanttee mit Wasser oder einer Lösungsmischung aus Wasser und niedrigem Alkohol zur Entfernung unlöslicher Bestandteile hydrothermal extrahiert, den erhaltenen Extrakt konzentriert, das erhaltene Konzentrat mit Wasser löst, die erhaltene Lösung zur Entfernung nichtpolarer Materialien mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, die erhaltene wäßrige Schicht konzentriert und die Flüssigkeit, welche von dem erhaltenen Konzentrat abgetrennt wurde, durch eine Säule erneut konzentriert.
11. Verfahren zur Herstellung eines Extraktes aus grünem Tee, wobei man getrocknete grüne Teeblätter, gerösteten Tee oder grünen Instanttee mit Wasser oder einer Lösungsmischung aus Wasser und niedrigem Alkohol zur Entfernung unlöslicher Bestandteile hydrothermal extrahiert, den erhaltenen Extrakt konzentriert, das erhaltene Konzentrat mit Wasser löst, die erhaltene Lösung zur Entfernung nichtpolarer Materialien mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert, die erhaltene wäßrige Schicht konzentriert und die Flüssigkeit, welche von dem erhaltenen Konzentrat abgetrennt wurde, durch eine Säule erneut konzentriert.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

FIG. 1

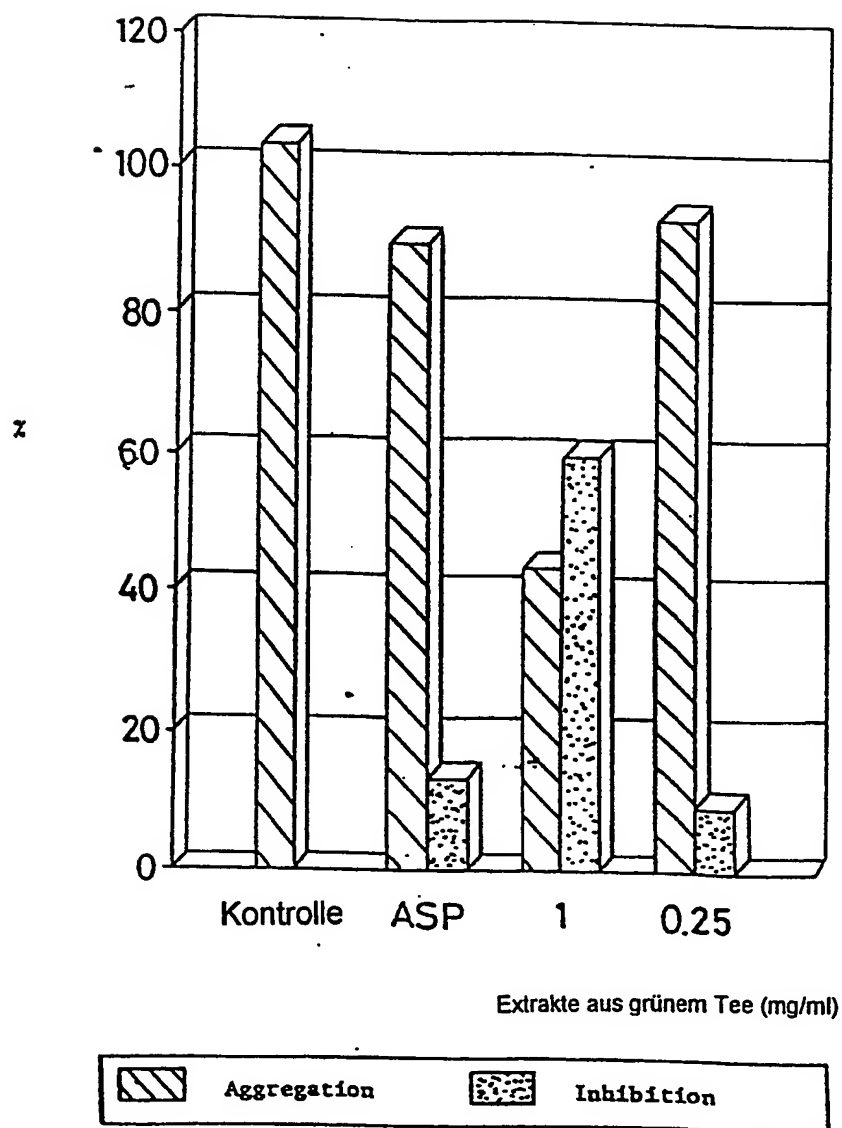


FIG. 2

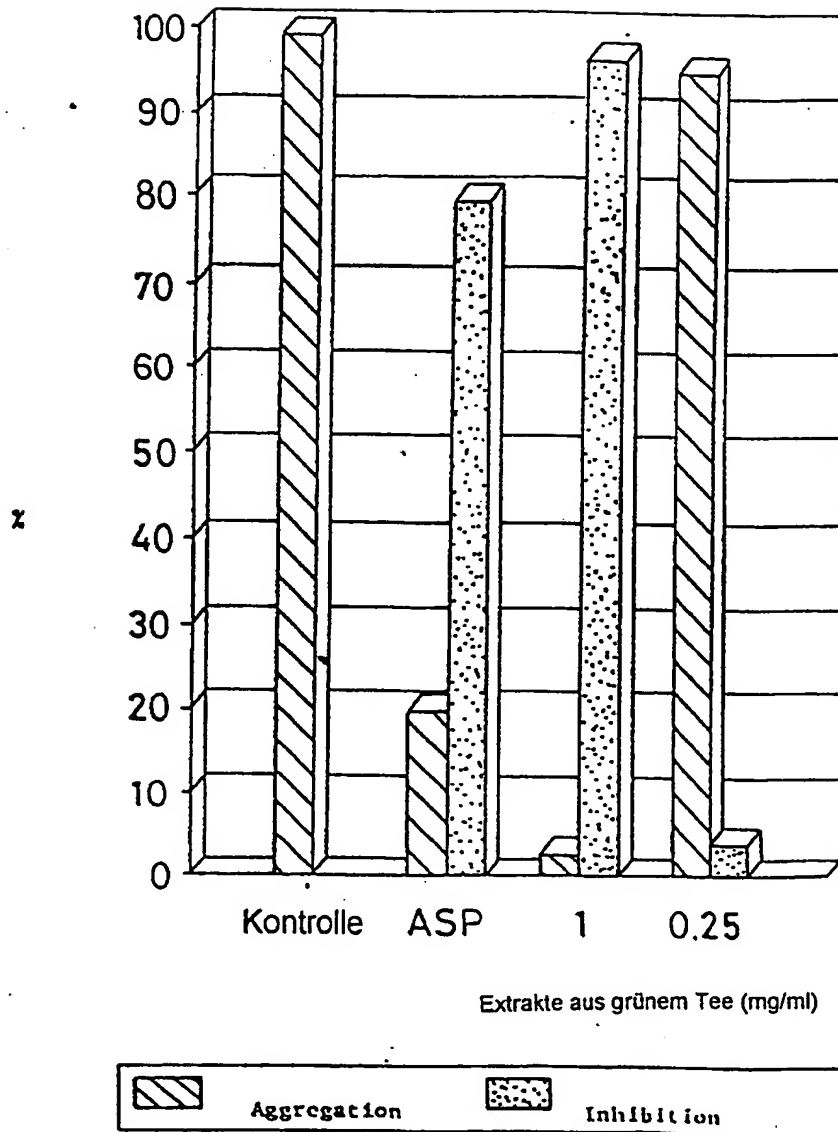




FIG. 3

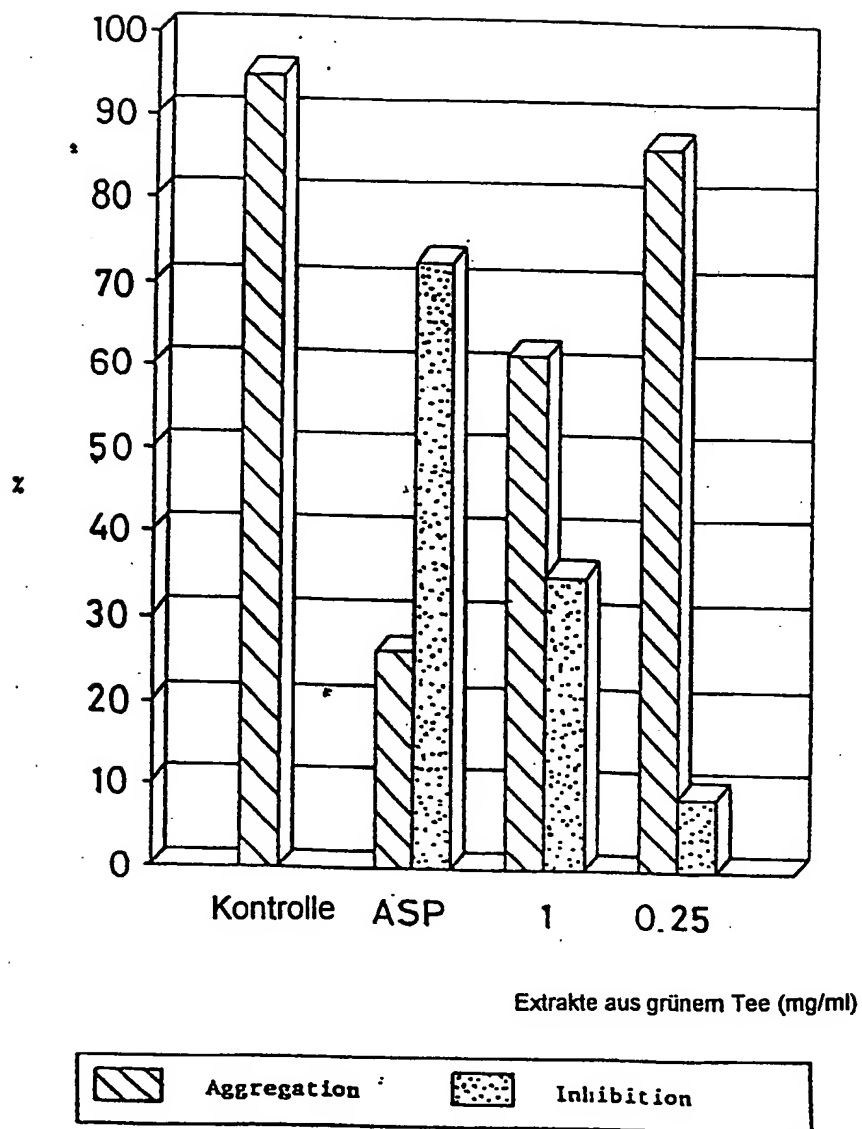


FIG. 4

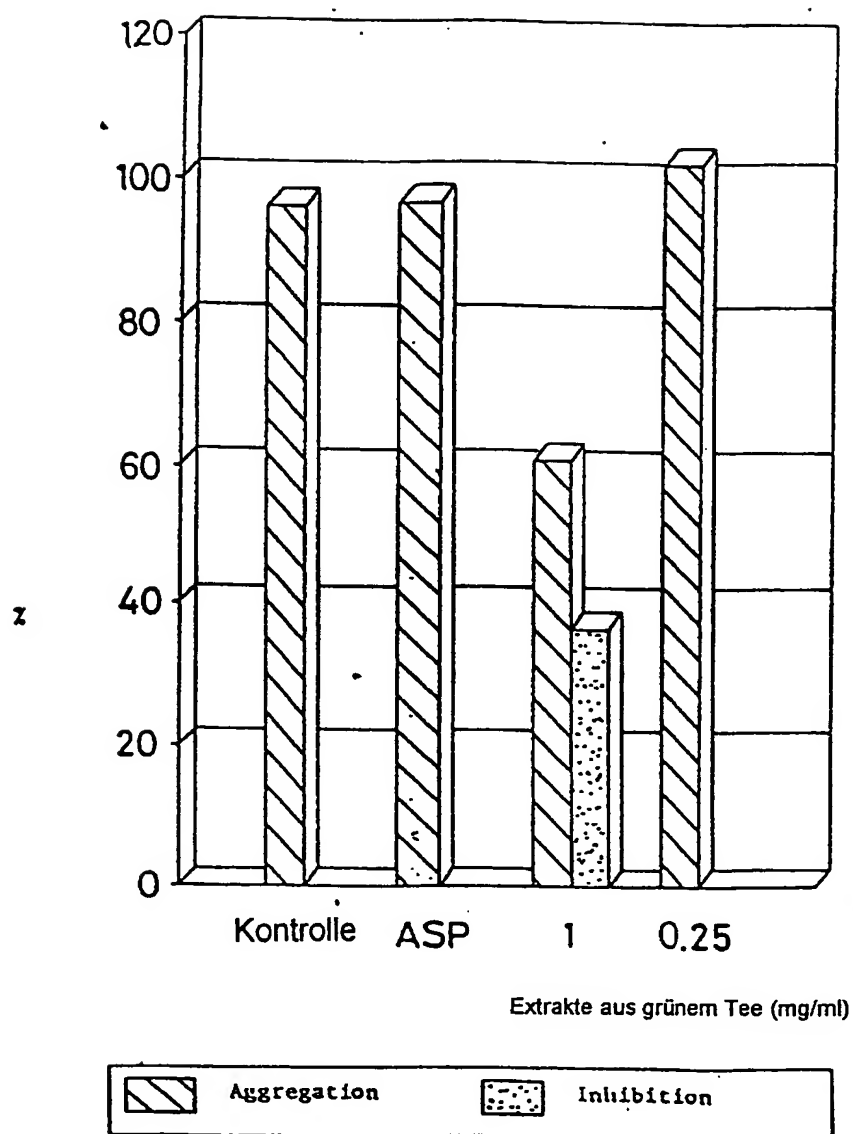


FIG. 5

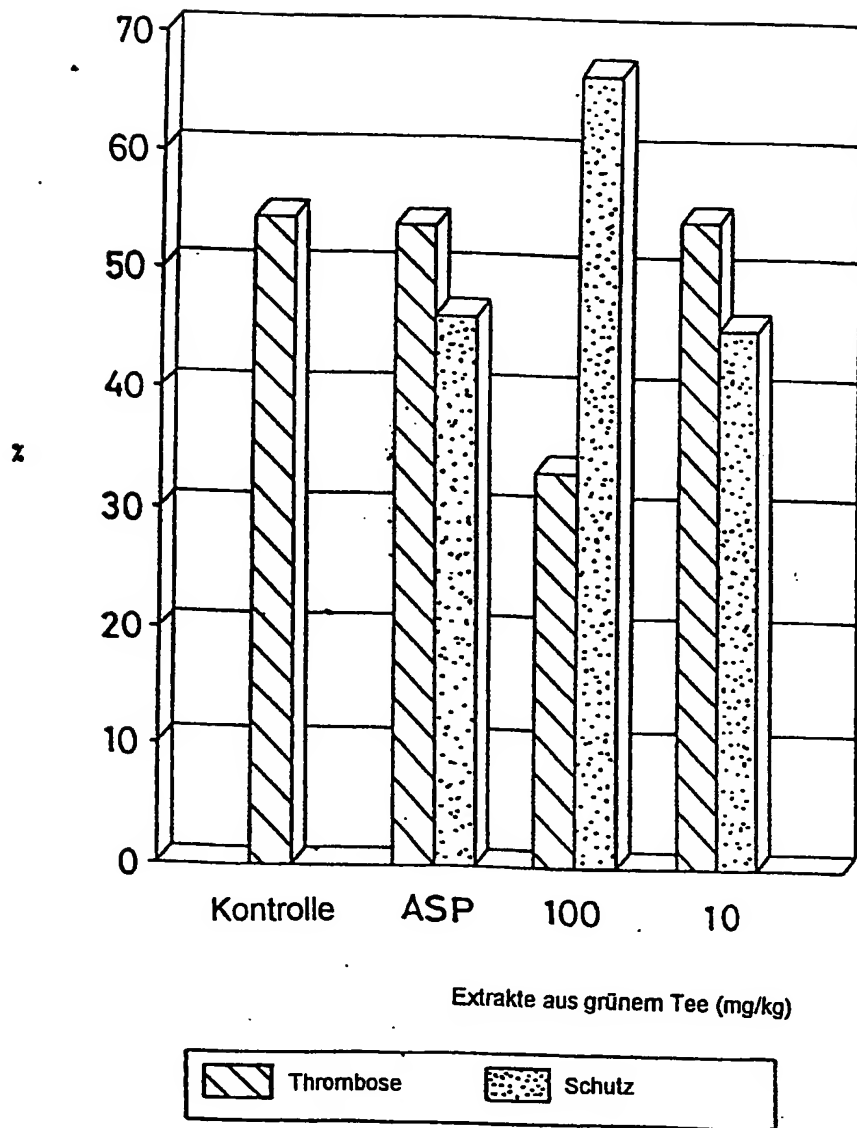


FIG. 6

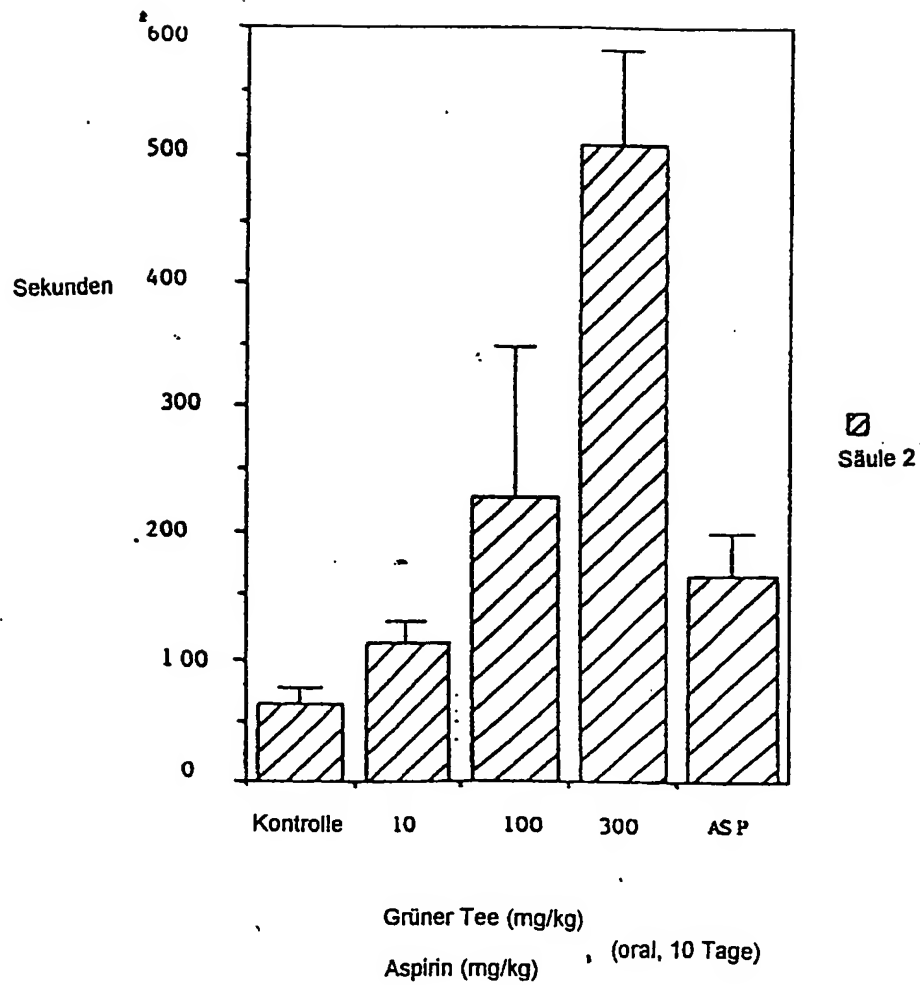


FIG. 7

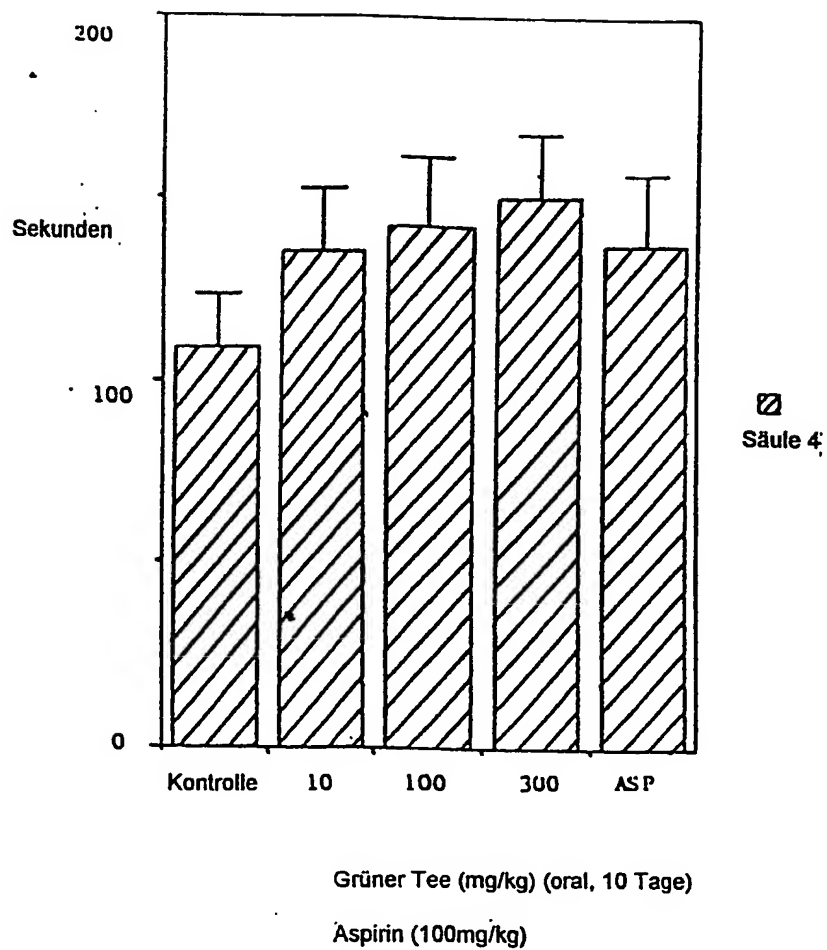
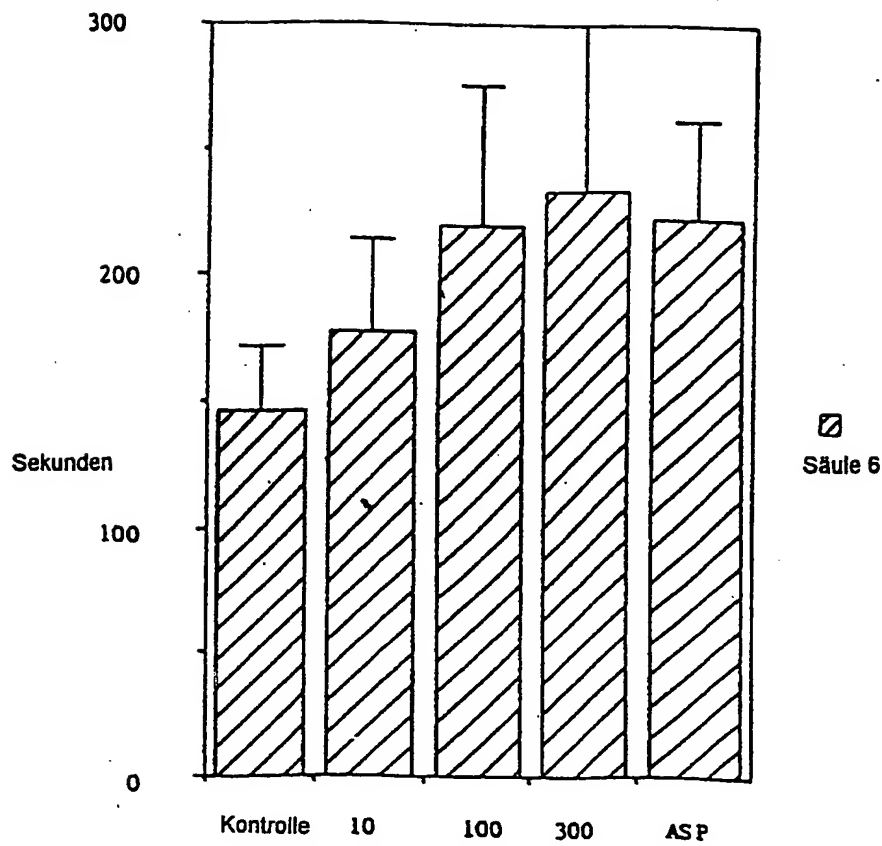


FIG. 8



Grüner Tee (mg/kg) (oral, 10 Tage)

Aspirin (100mg/kg)